

DEUXIEME THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

par

Jacques DESBORDES

Sujet : Origine et évolution des produits soufrés
dans la bière.

Soutenue le 30 JUIN 1970
devant la Commission d'Examen.

MM.

R. GAY, Président
A. ROSENBERG, Examineur
Ch. ALAIS, Examineur
M. METCHE, Examineur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551908_0032

DEUXIEME THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

par

Jacques DESBORDES

Sujet : Origine et évolution des produits soufrés
dans la bière.

Soutenue le 30 JUIN 1970

devant la Commission d'Examen.

MM.

R. GAY, Président
A. ROSENBERG, Examineur
Ch. ALAIS, Examineur
M. METCHE, Examineur



S O U M M A I R E

ORIGINE ET EVOLUTION DES PRODUITS SOUFRES DANS LA BIERE

--- * * * ---

- I - INTRODUCTION
- II - LES COMPOSES SOUFRES dans les MATIERES PREMIERES
de BRASSERIE
 - 1/ - L'eau
 - 2/ - Le moût
- III - BEVENIR des COMPOSES SOUFRES en FERMENTATION
 - 1/ - Incorporation du soufre minéral aux protéines
 - 2/ - Produits de dégradation soufrés
 - 3/ - Modifications des propriétés fermentaires de
certaines souches
- IV - COMPARAISON des TAUX de SOUFRE de DIVERS CONSTITUANTS
DANS la BIERE
- V - PRODUITS SOUFRES VOLATILS ayant pour ORIGINE des
TRANSFORMATIONS CHIMIQUES ou PHOTOCHEMIQUES
 - 1/ - Goût de soleil
 - 2/ - Produits soufrés de décomposition
 - 3/ - Absence de mercaptans dans la bière nouvellement
fabriquée
- VI - DEVELOPPEMENTS RECENTS des TECHNIQUES ANALYTIQUES
- VII - CONCLUSION

--- * * * ---

ORIGINE ET EVOLUTION DES PRODUITS SOUFRES DANS LA BIERE

I - INTRODUCTION

L'intérêt porté aux qualités organoleptiques de la bière a permis le développement de l'étude des composés volatils qui, bien que parfois présents en quantités très faibles, ont une forte incidence sur le goût de la bière. Parmi ces composés volatils, les produits soufrés occupent une place importante du fait que des dérivés du soufre tels que l'hydrogène sulfuré H_2S et certains mercaptans ont une odeur désagréable à l'état de traces. Les composés à base de soufre présents dans les matières premières telles que le malt et l'eau subissent des transformations durant la fermentation du moût. On les retrouve alors dans la bière où sous l'influence des conditions de stockage ils peuvent donner naissance à des produits de décomposition néfastes à la bonne qualité du produit. Nous nous attacherons donc à décrire les origines des composés soufrés dans la bière, à voir comment il est possible pratiquement de les contrôler et enfin à envisager les solutions éventuellement applicables pour limiter leurs effets.

III - Les COMPOSES SOUFRES dans les MATIERES PREMIERES de BRASSERIE

1/ - L'eau -

L'eau de fabrication utilisée en Brasserie présente toujours une composition plus ou moins importante en ions sulfuriques $SO_4^{=}$. La teneur est variable selon les sources

cystéine et la méthionine, ou encore dans des transporteurs d'électrons tels que le glutathion.

D'après KLEBER et LAMPL (3), on retrouve environ 62 % des produits soufrés des matières premières dans le moût avant l'ébullition. Cette teneur diminue jusqu'à atteindre 43,9 % dans la bière finie, une partie importante de la chute du pourcentage est attribuée à l'élimination de la cassure du moût, alors que le reste est attribué au métabolisme des levures. MASCHLEIN et Coll. (4) pensent que les variations de taux des composés soufrés dans le moût sont fonction de la teneur des matières premières, de l'intensité d'ébullition et de l'aération éventuelle du moût. Il ne semble pas que la méthode de brassage ait une quelconque importance, mais l'aération à chaud et l'élimination du trouble fin font chuter les doses de SH_2 et SO_2 . Enfin, les matières premières renferment des mercaptans qui ont été évalués par BRENNER et Coll. (5). Ainsi, ces auteurs indiquent que les teneurs en mercaptans varient entre 30 et 112 $\mu\text{g/kg}$ de malt exprimés en SH ; les grains crus ont une teneur inférieure à 100 $\mu\text{g/kg}$ et le houblon peut titrer jusqu'à 300 ou 400 $\mu\text{g/kg}$. Si SO_2 et SH_2 sont éliminés en grande partie lors de l'aération du moût, les mercaptans quant à eux ne varient que très peu (4).

Le tableau suivant constitué à partir des éléments rassemblés par MAW (6) et LAWRENCE (12), résume les teneurs des différents produits soufrés trouvés dans le moût, et la bière jeune.

Nature du soufre	Moût	Bière jeune
Sulfates	50 à 100 mg/l (3)	5 à 10 mg/l (5)
Soufre organique total	50 à 60 mg/l (3)	10 à 20 mg/l (3)
Sulfites	2 à 5 mg/l (5)	20 mg/l (5) 2 à 15,7 mg/l (11)
Acides aminés	cystine 8-15 mg/l (7) méthionine 28-30 mg/l (7) soufre 6 mg/l (8)	assimilés par les levures - traces provenant d'autolyse des cellules
Composés sulfhydrilés totaux en mg SH	0,2 à 1,1 mg/l (9)	0,4 à 2,9 mg/l (10)
Composés sulfhydrilés volatils	-	0,01 à 0,02 mg/l (6)
Mercaptans volatils	15 à 25 µg exprimés en S (1)	non détectés (13)
H ₂ S	13 à 37 µg en S (6)	12 à 24 µg (6)

TABEAU N° 1 : Composés soufrés dans le moût et la bière jeune.

La comparaison des dosages du soufre de différentes natures dans le moût et la bière (cf Tableau I) montre qu'il y a des variations importantes durant la fermentation. Ainsi, nous voyons que les éléments de soufre minéral et organique sont en quantité moindre dans la bière que dans le moût ; par contre, on constate que le taux des sulfites et des composés sulfhydrilés augmente.

L'étude de ces transformations biologiques fait l'objet du paragraphe suivant.

III - DEVENIR des COMPOSES SOUFRES en FERMENTATION - TABLEAU N° 2

Des études préliminaires de MAW (20) ont montré les variations des vitesses d'assimilation des acides aminés soufrés, utilisés comme source de soufre dans des cultures de différentes souches de Saccharomyces cerevisiae. La levure a été cultivée sur milieu synthétique en présence de composés marqués $35S$. Les résultats de ces expériences indiquent que la L-méthionine est absorbée rapidement et complètement ; cependant, la L-cystéine est absorbée beaucoup plus lentement, tandis que la L-cystine ne l'est pas du tout.

L'assimilation de la DL-éthionine est incomplète et si la S-méthyl-L-cystéine et la S-éthyl-L-cystéine sont assimilées rapidement pendant une période courte de la fermentation, le soufre marqué augmente peu après dans le milieu, ce qui tend à prouver que le soufre assimilé est à nouveau rejeté dans le milieu (durée 1/2 heure).

L'absorption par ordre décroissant d'importance de ces différents produits est le suivant :

L-méthionine ; DL-éthionine ; L-cystéine ;
S-méthyl - L-cystéine ; S-éthyl - L-cystéine et
 SO_4Na_2 .

HAV fait remarquer aussi que l'assimilation des S-amino-acides est inhibée par les fortes concentrations en acides aminés autres, quand ceux-ci ont une ressemblance structurale avec les précédents.

Ainsi l'absorption de la cystéine est freinée par la présence de glutathion réduit. Cet effet inhibiteur serait dû à des modifications de transport des acides aminés dans la cellule de levure.

Voyons d'après le tableau 2 les possibilités d'incorporation du soufre minéral dans les protéines.

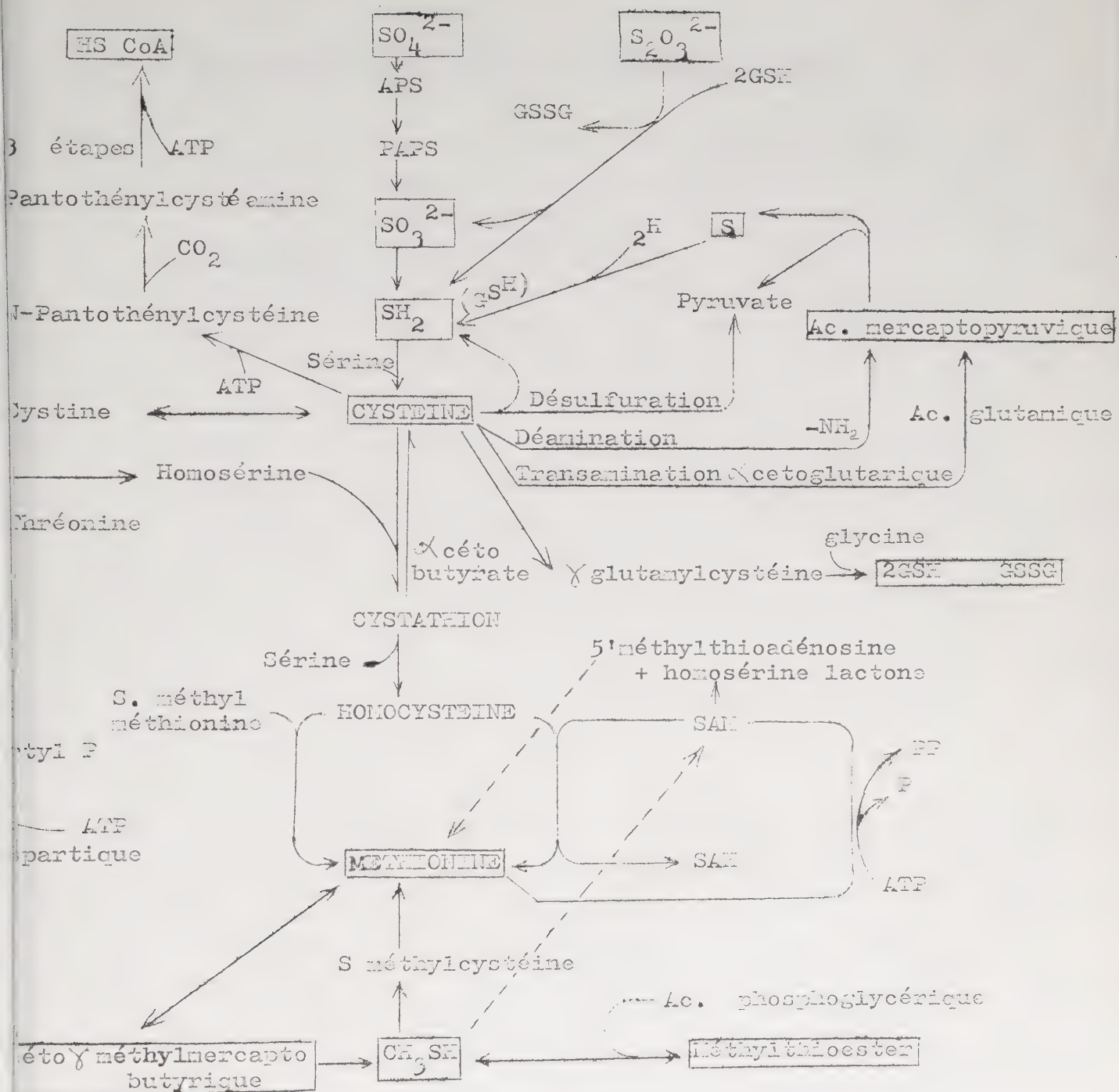
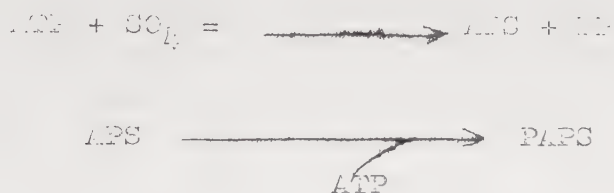


TABLEAU N° 2 : Résumé des principales voies du métabolisme soufré des levures.

Les molécules dont le nom est encadré sont à l'origine des produits soufrés dans la bière.

1/ - Incorporation du soufre minéral aux protéines

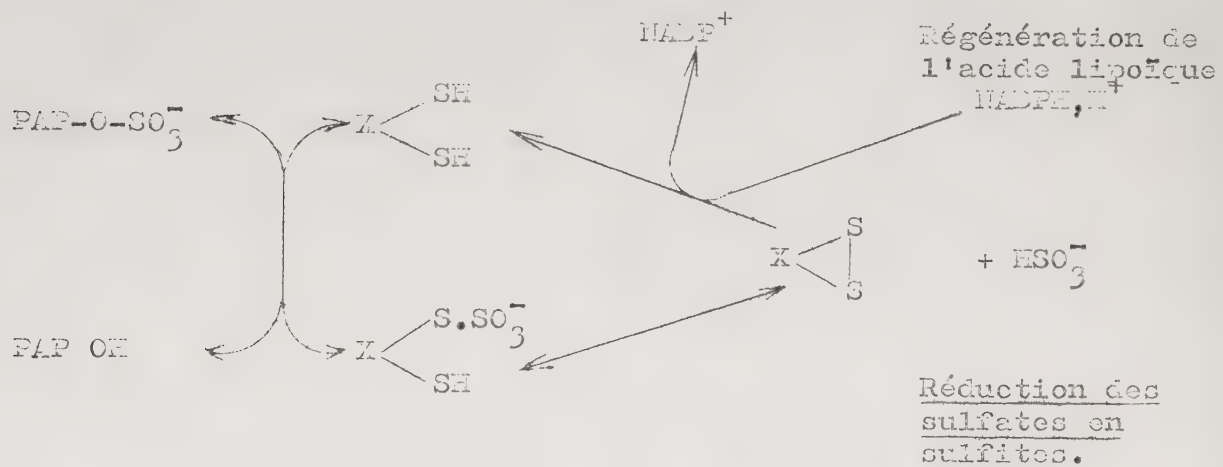
Le tableau n° 2 résume les principales voies du métabolisme du soufre par la levure. Ce problème a été étudié par LAW (6), puis LAWRENCE et Coll. (13). La levure Saccharomyces cerevisiae, microorganisme sulfato-réducteur (14) incorpore le soufre au degré d'oxydation 6 pour l'amener sous forme de sulfure nécessaire pour la synthèse des acides aminés soufrés. La réduction des sulfates en sulfure serait un processus énergétique nécessitant une activation au moyen d'ATP. Deux composés intermédiaires interviennent, d'abord l'Adénosine 5' phosphosulfate (APS), puis la 3' phosphoadénosine 5' phosphosulfate (P-APS) (6). La réaction d'activation libère du pyrophosphate.



Les enzymes intervenant dans ces deux réactions sont d'abord une ATP sulfurylase puis une APS kinase. Notons que les ions Mg^{2+} sont activateurs de la réaction et que le sulfite peut servir aussi comme substrat. Par contre, l'ATP sulfurylase est inhibée par des concentrations faibles en APS et PAPS, de même que par S^{2-} , ce qui semblerait indiquer que le sulfate n'est pas incorporé lorsque par exemple la cystéine et la méthionine sont en excédent dans le milieu.

La réduction des sulfates en sulfites puis sulfures a été montrée par HILZ et KITTLER (17). Une PAPS réductase fonctionnant avec le coenzyme NADP réduit et présentant un

groupement prosthétique acide lipoïque interviendrait alors dans le mécanisme résumé ci-dessous.



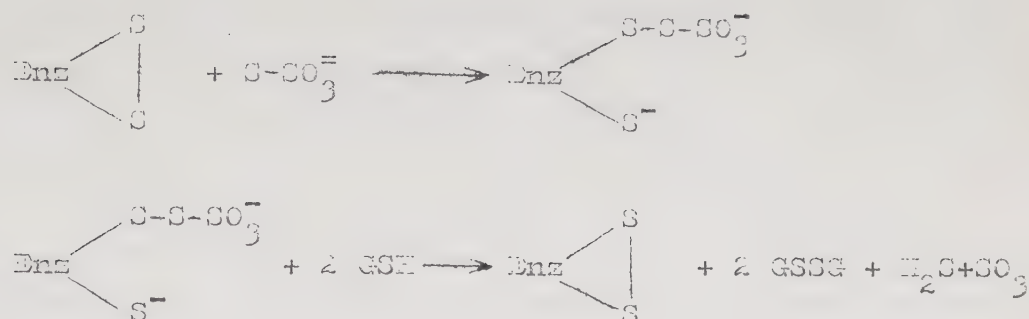
Si l'intervention décrite de l'acide lipoïque (X) dans la système sulfate actif réductase demeure contestée (10), il ne demeure pas moins qu'un dithiol est nécessaire pour que la réaction se fasse.

Le passage des sulfites à SO₂ n'est pas encore élucidé quant au nombre des étapes. Pourtant on sait qu'il nécessite le coenzyme H₂A - spécifique de la réductase H₂S peut être formé aussi à partir du thiosulfate (11) par l'intermédiaire du glutathion. En effet, la réaction enzymatique se ferait comme suit (6) chez les levures :



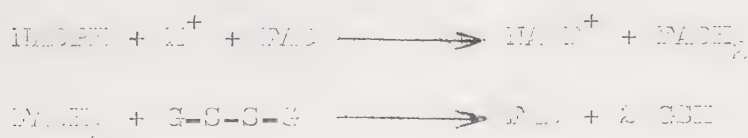
Cette incorporation serait faite au moyen d'un mécanisme décrit par analogie avec les mécanismes trouvés chez

les mammifères (19), selon le schéma suivant :



La réaction serait catalysée par une thiosulfate réductase en présence de glutathion réduit.

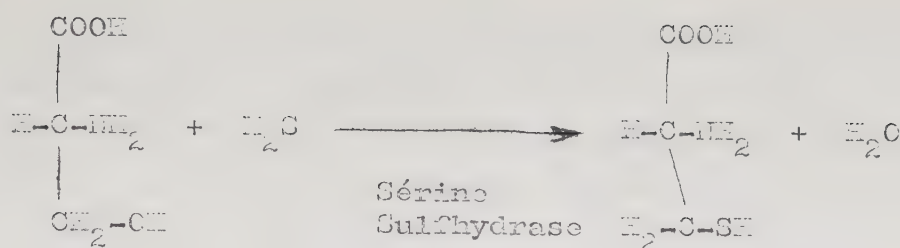
La réduction du glutathion intervenant dans cette réaction serait assurée par une flavoprotéine glutathion-réductase à groupements disulfures, et fonctionnant de manière spécifique avec le coenzyme NADP (19) selon les deux réactions suivantes :



Les deux voies de métabolisme du soufre minéral résumées ci-dessus sont les principales.

Nous allons voir comment le soufre est incorporé à la cystéine, puis à la méthionine (cf Tableau 2).

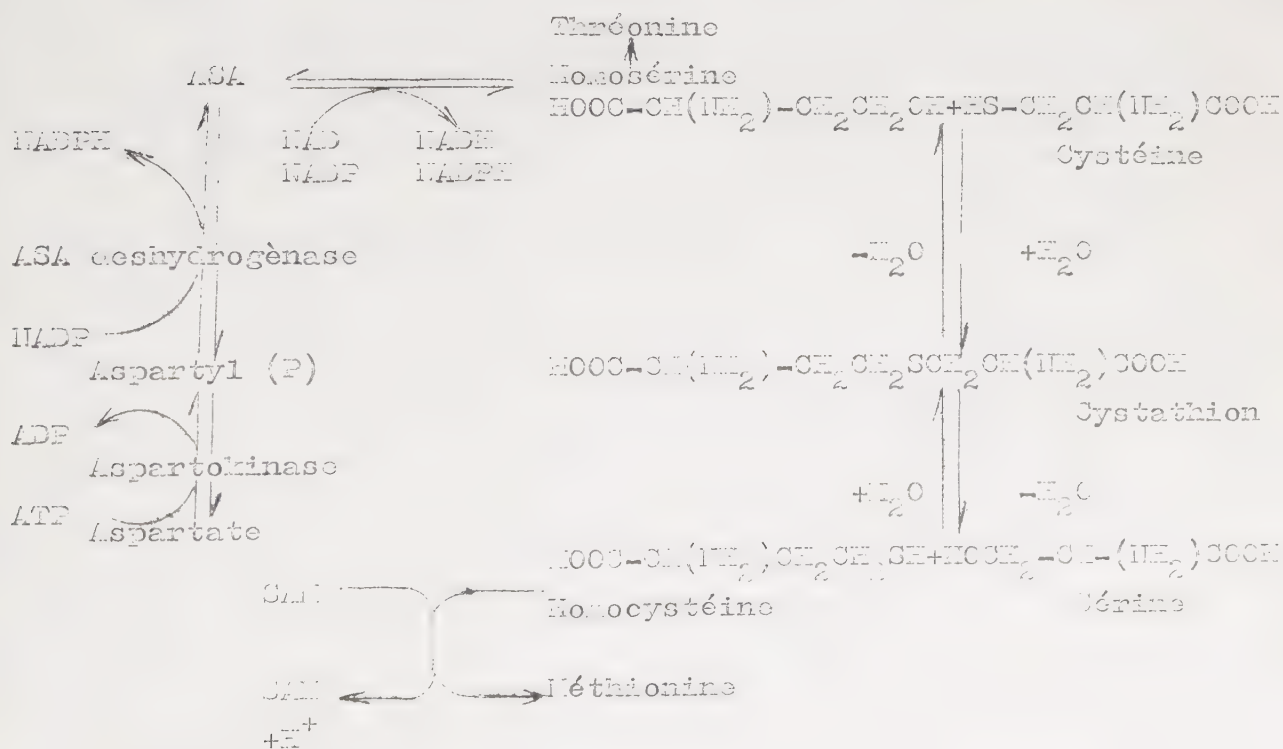
La sérine en présence d'ions sulfures donne de la cystéine par une réaction catalysée par la sérine sulfhydrase (15).



La cystéine formée peut être utilisée soit dans la synthèse de la méthionine, soit dans les synthèses du coenzyme A, de la biotine, de la thiamine ou du glutathion.

HAN (6) a montré par incorporation de $^{35}\text{SO}_4$, la répartition du soufre d'origine minérale dans la protéine.

Le passage de la cystéine à la méthionine se fait par la formation de l'intermédiaire cystathion avec apport d'une molécule d'homosérine; le schéma suivant résume cette synthèse.



L'incorporation des sulfures dans la cystéine et la conversion de la cystéine en méthionine comme on le montre dans les réactions précédentes, seraient des processus régulés par les produits terminaux tels que la méthionine et la thréonine qui contrôlèrent la synthèse des trois enzymes nécessaires (13)(16). Le semi-aldéhyde aspartique (ASA) serait le répresseur et l'inhibiteur de l'aspartokinase. Enfin, après formation de l'intermédiaire cystathion, l'homocystéine résultant du clivage se combine avec une molécule de S-adiénosyl-méthionine (SAM), ce qui permet l'addition d'un groupement méthyl pour donner de la méthionine.

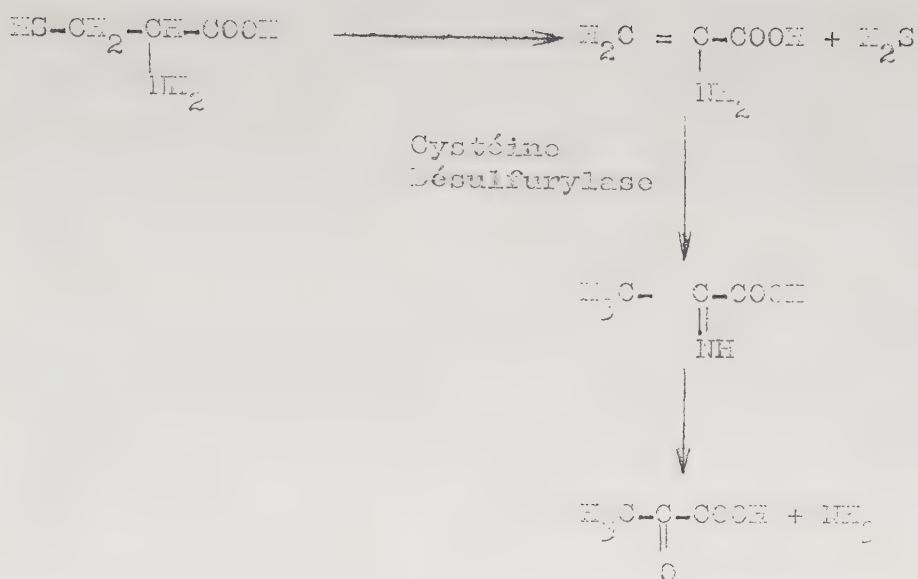
2/ - Produits de dégradation soufrés

Nous avons vu que la synthèse des produits soufrés pouvait entraîner une production d' H_2S , lors de l'incorporation du soufre minéral dans la levure.

Les produits de dégradation de la cystéine conduisent aussi à la formation d'hydrogène sulfuré ; ainsi trois voies sont proposées (6)(17).

a) - Désulfuration de la cystéine

La cystéine, cette première voie, serait d'abord désulfurée en acide α aminoacrylique, puis ensuite déaminée pour conduire au pyruvate.



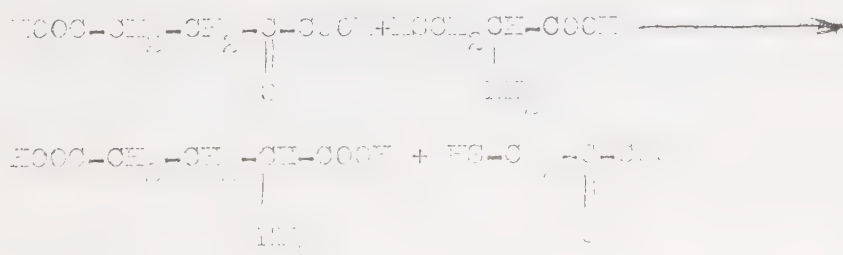
b) - Déamination de la cystéine

La seconde voie conduirait à la formation d'acide mercaptopyruvique (6).



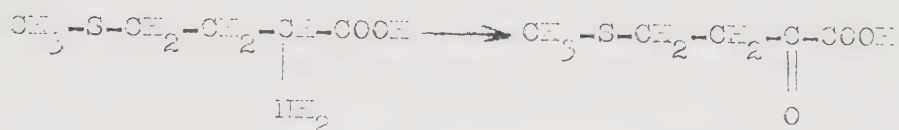
c) - Transamination

La cystéine pourrait échanger une fonction amine avec l'acide α -céto-glutarique pour donner de l'acide glutamique et de l'acide β -mercapto-pyruvique.



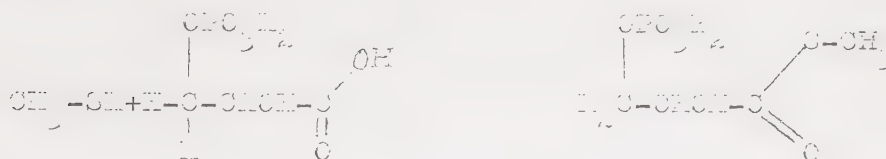
L'acide β -mercapto-pyruvique résultant des processus (b) et (c) serait ensuite décomposé en soufre et acide pyruvique, puis le soufre serait réduit en présence de glutathion dans une réaction chimique pour donner H_2S .

Les produits de dégradation de la méthionine conduisent à la formation de mercaptans; aussi, la déamination de la méthionine peut donner naissance à un dérivé ceto tel que l'acide α -ceto γ -méthyl mercapto-butyrique.



La désulfuration conduit alors à la formation de méthylmercaptan (CH_3SH) (cf Tableau 4).

Le méthylmercaptan, de forme très active, peut réagir avec des acides tels que l'acide β -phosphoglycérique pour donner le β -phosphoglycéryl-méthylthio-ester.



L'éthyl-mercaptan ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$) aussi très réactif chez les levures serait obtenu par une voie similaire à partir de l'éthionine.

3) - Modifications des propriétés fermentaires de certaines souches

STEWART et Coll. (41) ont étudié les effets de l'acide pantothénique sur certaines souches de levures du genre *saccharomyces cerevisiae*, fortes productrices d' H_2S ; l'essai porte sur 90 souches, principalement de brasserie. Les auteurs ont constaté que 50 $\mu g/l$ de pantothénate de calcium sont suffisants pour réduire en quantité et en vitesse la production d' H_2S ; ils remarquent que la β alanine à 500 μg par litre est presque aussi efficace que le pantothénate.

Ces expériences ont été conduites sur milieu de WICKERMAN et l'on a remarqué que les cultures sur ce milieu dépourvu de DL-éthionine procuraient une augmentation de la teneur en H_2S au-delà de celle fournie en absence du seul pantothénate.

Sur les milieux liquides, ces levures accroissent leur production en H_2S et CO_2 en absence de pantothénate. L'apport du pantothénate à 50 $\mu g/l$ réduit de façon substantielle la production de H_2S et CO_2 .

Bien que décrivant le phénomène pantothénique, ces expériences n'ont pas permis d'expliquer pourquoi sur les moûts ne présentant pas de déficience en pantothénate, les levures fabriquaient parfois de l'hydrogène sulfuré en excès. En fait, pour tenter d'expliquer cette anomalie de fermentation, LAWRENCE (15) resume ainsi les points importants de la régulation du métabolisme

des composés soufrés chez les levures.

- a) - La formation des sulfures est réduite si à la fois le pantothénate et la méthionine font partie du milieu.
- b) - La vitesse d'incorporation du sulfate est déprimée par la méthionine, alors qu'elle est accélérée par le pantothénate.
- c) - L'ATP sulfurylase est inhibée fortement par les produits suivants de cette voie métabolique à de faibles concentrations (inhibée par APS, P-APS, SO_2 ou H_2S).
- d) - L'ATP sulfurylase est réprimée par la méthionine et déréprimée par la cystéine.
- e) - La cystéine-désulfhydrase est inhibée par la S-adénosylméthionine-intra-cellulaire.

A partir de ces données essentielles, différentes hypothèses de régulation ont été émisees. Ainsi, celle selon laquelle le pantothénate serait impliqué dans la conversion de la cystéine en méthionine. En présence d'une quantité suffisante de pantothénate, le passage de sulfate en méthionine serait normal, mais dans le cas d'une carence en pantothénate la conversion de cystéine en méthionine serait inhibée et la cystéine serait désulfhydrée pour donner H_2S .

Pour de WTC (22), la régulation de la synthèse de la cystéine interviendrait à deux niveaux : d'abord par inhibition directe de l'ATP sulfurylase par APS et PAPS et

ensuite par "feedback-control" par les ions sulfure. Dans l'hypothèse de défaillance du "feedback-control", la méthionine réprimerait la synthèse de l'ATP sulfurylase et la cystéine réprimerait la synthèse de la sulfite réductase, ce qui éviterait une production excessive de cystéine.

En ce qui concerne la décomposition de la cystéine par la cystéine désulfhydrase, la S-adénosyl-méthionine provenant de la méthionine exercerait une inhibition par "feedback", ce qui permettrait d'expliquer les effets de la méthionine sur la production de SH_2 à partir de la cystéine. La plus grande vitesse d'assimilation de cette dernière est en faveur de cette hypothèse.

En définitive, les deux voies principales de production d' H_2S dans les fermentations seraient dues soit à une perte en sulfure pendant les synthèses des acides aminés soufrés, soit à un blocage de cette synthèse.

Ces effets secondaires peuvent être produits par les modifications des conditions de culture, notamment par l'accroissement de la température. Il est reconnu dans ce cas qu'une élévation de température favorise la production d' H_2S .

Enfin, si les ions tels que Mg^{2+} ou K^+ ont des rôles activateurs dans la réaction de formation de H_2S , les métaux lourds seraient en général assez néfastes. Aussi, la formation de SH_2 en présence de mercure ou de cuivre serait un mécanisme de détoxification des levures vis-à-vis de ces métaux ; le phénomène apparaîtrait très amplifié lorsque les souches sont classées comme résistantes aux métaux (particulièrement au cuivre), alors que la production

$C'E_{1/2}$ est faible pour des souches peu résistantes. Cependant, on ne peut pas généraliser ce caractère car des expériences contradictoires n'ont pas permis de prouver que l'aptitude des cellules à produire du SCH_2 pouvait entrer en corrélation directe avec leur cupro-résistance.

IV - COMPARAISON des TAUX de SOUFRE de DIVERS CONSTITUANTS SOUFRES dans la BIÈRE

Pour situer l'importance relative de tous les composés soufrés dans la bière, une étude de HASHIMOTO et Coll. (43) décrit les résultats des analyses pratiquées sur des échantillons de bières japonaises.

Le soufre total dans les bières, se divise en 58 % de soufre organique et 42 % de soufre minéral, tandis que ce même soufre total se divise en 94 % de soufre non volatil et 6 % de soufre volatil. Le soufre sous forme de SCH_2 constituerait 36 % du soufre minéral et 36 % du soufre total. Son origine principale serait le moût et le houblon et sa teneur demeurerait presque inchangée durant la fermentation et la garde.

Une partie du soufre organique (environ 58 %) serait constituée par des composés soufrés inactifs dont on ne connaît pas très bien l'origine. Les composés non volatils sous forme disulfures -S-S- représentent environ 24 % du soufre total et 41 % du soufre organique ; leur provenance se situe dans les matières premières de Brasserie et leur taux décroît lentement pendant la fermentation principale, alors qu'inversement il croît pendant la garde. Une partie importante de ces composés serait de bas poids moléculaire.

Les composés sulfhydrilés non volatils qui ne représentent que 3,7 % du soufre total ou 6,4 % du soufre organique sont formés de manière importante pendant la fermentation principale, mais leur teneur ne varie que très peu durant la garde. La distribution des masses moléculaires dans ces composés est dirigée vers des poids élevés de plusieurs milliers et il semblerait que ces produits jouent un rôle dans la conservation de la bière puisque leur taux diminue par oxydation pendant le stockage de la bière conditionnée.

Les produits soufrés importants dans la formation de l'arôme de la bière sont les éléments volatils. Néanmoins, l'élément essentiel du soufre volatil est constitué par SO_2 qui représente environ 5,9 % du soufre total de la bière. Sa formation est accomplie durant la fermentation principale et on ne constate pas de variation durant la garde. Son taux décroît cependant durant la conservation de la bière conditionnée.

Enfin, les composés volatils les plus néfastes tels que thiocarbonyls ou SH_2 sont présents à l'état de traces. H_2S d'origine principale fermentaire, serait formé préférentiellement au début de la fermentation principale, alors que son taux diminuerait vers la seconde partie de cette fermentation active ; sa teneur est faible (0,02 % du soufre total). Sa disparition pourrait être expliquée par un entraînement gazeux par le gaz carbonique fermentaire en même temps que par la chute du pH qui défavoriserait son maintien en solution. Le goût de jeune est ainsi très atténué.

V - PRODUITS SOUFRES VOLATILS ayant pour ORIGINE des TRANSFORMATIONS CHIMIQUES ou PHOTOCHEMIQUES

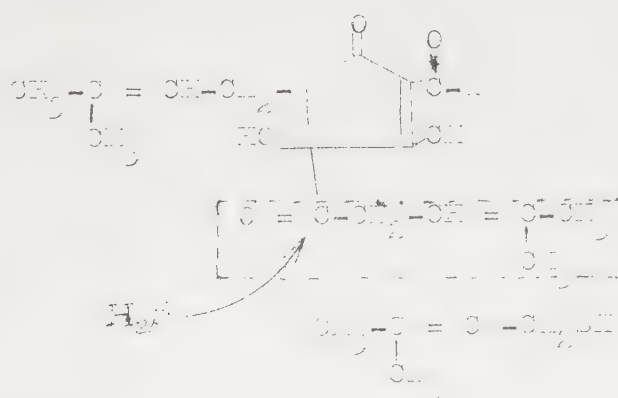
Comme nous l'avons vu ci-dessus, les produits volatils ne représentent qu'une partie anecdotique du soufre total de la bière ;

cependant leur instabilité et leur grande réactivité conduisent à différentes combinaisons chimiques qui peuvent présenter occasionnellement une importance prépondérante dans l'évolution du goût de la bière finie. Les transformations subies sont chimiques ou encore photochimiques.

1/ - Goût de soleil

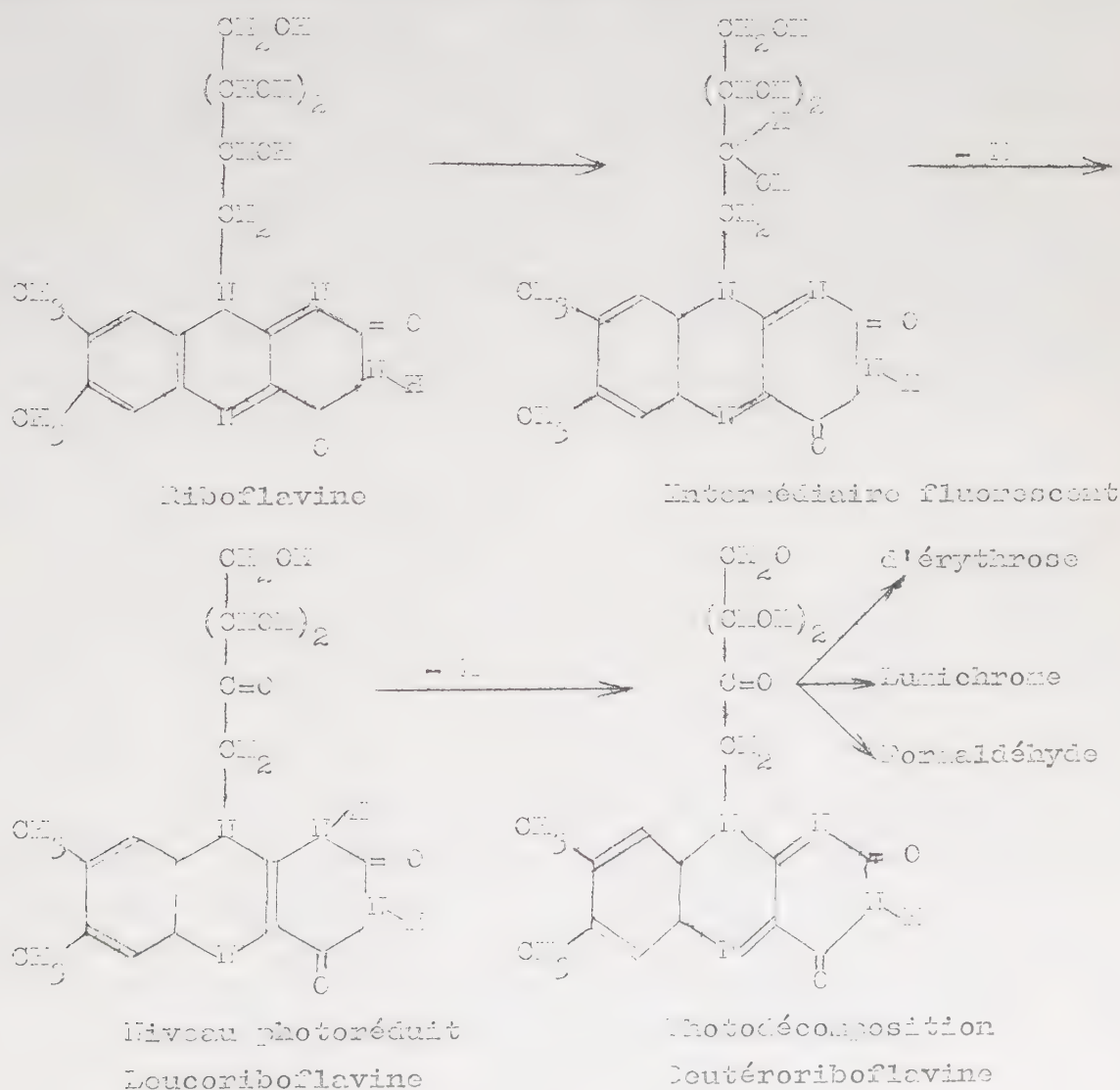
Depuis longtemps, l'apparition du goût de soleil dans la bière a été reconnu comme une modification du milieu faisant intervenir des composés soufrés, tels que des mercaptans odorants qui auraient des précurseurs fabriqués par les levures pendant la fermentation (24)(10).

Les travaux de OBATA et Coll. (25) ont permis de faire la liaison entre la présence de certains mercaptans et de composés isomérisés des humulones sous l'influence de la lumière. Il en résulterait un arrachement du radical 3-méthyl-2-butényl de l'isohumulone pour former un mercaptan, le 3-méthyl-2-butène-1-thiol par combinaison avec des composés sulfurés très actifs dans la bière (cf schéma suivant).



Ces travaux ont été confirmés analytiquement par KUROIWA et Coll. (26)(27). Ainsi, seule la partie organo-soluble de houblon intervient dans l'apparition du goût de soleil et la fraction lupulone après ébullition ; le rôle des transporteurs

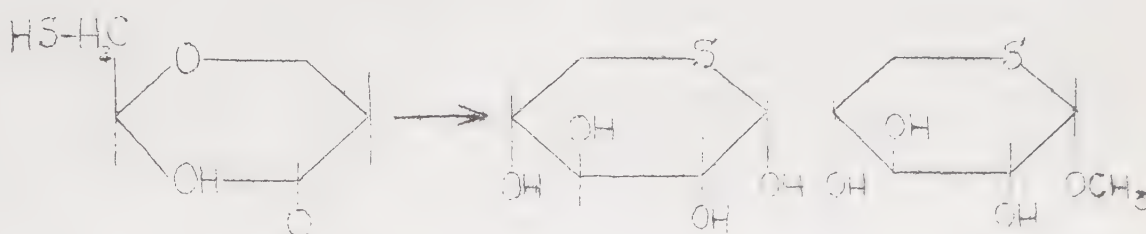
d'électrons dans l'instabilité des groupements sulfhydrilés et de H_2S a été l'objet d'études parallèles (28). Les résultats montrent que durant l'exposition à la lumière de 400 à 500 $m\mu$ de longueur d'onde (vers le maximum d'absorption de la riboflavine), la quantité de H_2S dégagée dans la bière est plus élevée en présence de riboflavine si le milieu est réducteur. En fait, l'intermédiaire activateur de production d' H_2S serait un produit de la décomposition photochimique de la riboflavine au stade dit de "Fluorescence" comme on peut le voir sur la figure suivante.



La riboflavine dans ces essais (26) a été substituée aux flavines généralement plus abondantes dans la bière telles que FAD, FMN. Néanmoins, l'auteur pense que la photodégradation de ces produits suit ces mêmes voies et que ses effets sont très comparables à ceux décrits plus haut.

La combinaison de H_2S et du résidu β -méthyl-2-butényl provenant des isohumulones serait elle aussi photochimique. L'origine de H_2S est aussi bien localisée dans des composés soufrés dialysables que non dialysables, mais les mercaptans actifs joueraient un rôle prépondérant dans la formation du β -méthyl-2-butène-1-thiol responsable du goût de soleil.

Des produits intermédiaires éventuels pourraient être les dérivés soufrés des sucres. En effet, d'après HICK (29), certains mercaptals de sucres interviendraient dans la réaction de formation du mercaptan. Ce même auteur décrit la formation des thiosucres selon le schéma suivant (30).



Des monosaccharides libres sous forme hémiacétal, sont cyclisés par réaction entre le carbonyle intramoléculaire et un groupe hydroxyl. Dans ce cycle, l'oxygène est facilement remplacé par de l'azote ou du soufre. C'est de cette manière que se formeraient des β -thiosucres par suite de la grande réactivité des groupes mercaptans.

Le 3-méthyl-2-butène-1-thiol n'est cependant pas le seul dérivé du soufre néfaste à la bière ; c'est ce que nous essaierons de montrer dans le paragraphe suivant.

2/ - Produits soufrés de décomposition dans la bière

Les conditions d'oxydo-réduction de la bière influencent certainement les équilibres entre les thiols et les disulfures, comme dans la réaction ci-dessous :



La présence d'ions métalliques plurivalents (30) et d'oxygène favorise ces réactions ; aussi, les thiols sous l'influence de l'air subissent une deshydrogénation pour donner le disulfure correspondant en présence de fer ou de cuivre. L'effet correspondant sur une protéine, par la présence de cystéine capable de s'oxyder en cystine, serait une diminution de la solubilisation et influencerait de façon défavorable la stabilité de la bière. De même, des composés soufrés préexistant sous la forme disulfure peuvent être réduits sous forme thiol et ensuite réoxydés dans la fraction protéique en présence de tanins pour donner des complexes tanins-protéines qui transformeraient le trouble au froid réversible en trouble d'oxydation permanent.

Une étude ultérieure du même auteur (31) porte sur les modifications de la stabilité des groupements sulphydrilés dans des bières allemandes de microfabrication.

Il ressort qu'après six mois de stockage, la teneur en SH diminue de façon considérable et ce processus est accéléré si le pH de la bière est augmenté vers la neutralité.

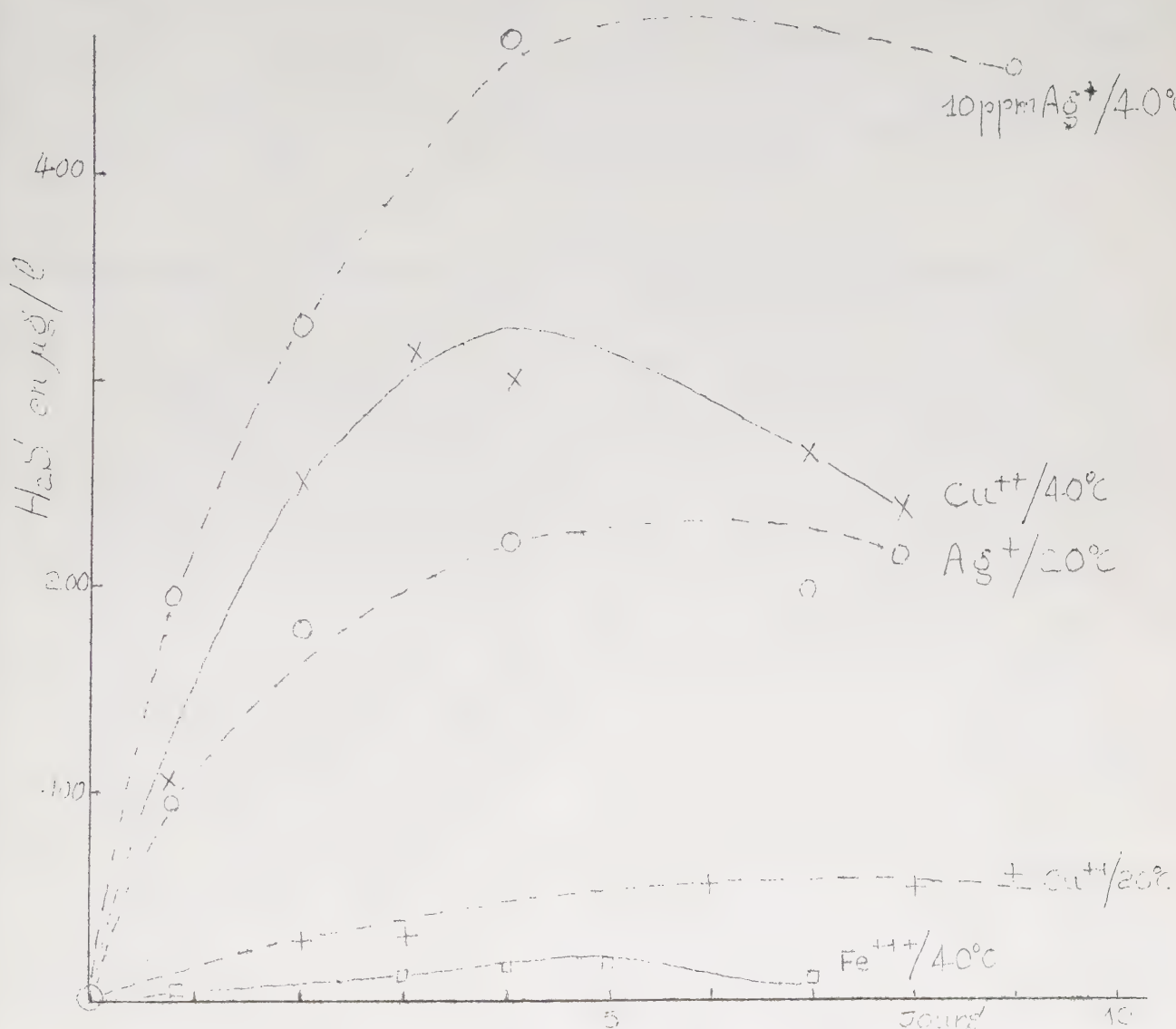
Des ajouts de glutathion à pH constant confirment une diminution rapide des SH. Enfin, l'action d'un réducteur décolorant usuel dans la bière, tel que l'acide ascorbique, se manifeste par un freinage de la disparition des produits sulfhydrilés ; là encore le processus est plus lent à l'abri de la lumière qu'en présence de lumière. Ce phénomène est imputé au fait que les sulfures protégeraient l'acide ascorbique de l'oxydation, plutôt qu'à une éventuelle action de l'acide ascorbique dans les processus enzymatiques qui catalysent l'oxydation des groupements sulfhydrilés.

Les résultats de SINCLAIR (32) publiés récemment au dernier Congrès de l'European Brewery Convention soulignent l'influence de la température de stockage sur la formation d' H_2S à partir des produits soufrés instables dans la bière. Ainsi, la quantité d' H_2S formée dans la bière de fermentation haute passe de 3 $\mu\text{g/l}$ à environ 16 $\mu\text{g/l}$ en douze semaines de stockage à 20° C., alors qu'à 0° C. la quantité demeure entre 2 et 3 $\mu\text{g/l}$.

Pour des bières de fermentation basse dans les mêmes conditions, le taux de H_2S monte à un maximum de 7 $\mu\text{g/l}$ au bout de huit semaines, pour retomber à 4 $\mu\text{g/l}$ au bout de douze semaines. Ces mêmes bières stockées à 0° C. présentent un taux moyen d' H_2S libre d'environ 1 $\mu\text{g/l}$ pendant le temps de l'expérience.

Les essais à très haute température, toujours à l'abri de la lumière, indiquent que le taux d' H_2S de décomposition peut monter jusqu'à 50 $\mu\text{g/l}$ dans la bière haute.

Les effets combinés des ions métalliques et de la température conduisent aux résultats résumés dans la figure suivante (32).



On voit d'après cette figure que l'influence des ions métalliques est très importante, car ils font monter la teneur en H_2S à des taux prohibitifs. Inversement, la présence des thiols dans la bière est minime pour la zone de pH 3 à 5, quelle que soit la température.

SINCLAIR indique que l'effet catalytique des ions métalliques peut être éliminé par addition d'EDTA, ce qui suggère une complexation éventuelle de ces ions avec les produits soufrés dans la bière. Si jusqu'alors les essais sur des systèmes contenant de la cystine, de la cystéine, de la méthionine ou du glutathion se sont montrés infructueux, il n'en demeure pas moins que le soufre doit nécessairement se présenter sous forme S^{2-} ou SH^- pour être précurseur direct d' H_2S dans la bière.

3/ - Absence de mercaptans dans la bière nouvellement fabriquée

Dans la bière jeune, seuls SO_2 et H_2S constituent des éléments importants volatils pouvant affecter le goût ou l'odeur de la bière. Pendant longtemps on a cru que des mercaptans intervenaient dans le goût de jeune parce que les méthodes analytiques utilisées faisaient intervenir un chauffage des échantillons soufrés, et que cette élévation de température était la cause de la formation de mercaptans par suite de la décomposition de certains produits soufrés. Mais les applications de la chromatographie en phase gazeuse avec des techniques de prélèvement des produits volatils à froid ont permis de montrer que les mercaptans étaient absents de la bière jeune.

Ces résultats ont été confirmés par les travaux de LASCHLEIN (4) et plus tard par ceux de OKUDA (35) qui signalent ne pas avoir retrouvé de mercaptans dans les gaz de fermentation.

En utilisant une méthode d'extraction des sulfures volatils par l'azote dans la bière refroidie, et par piégeage sous forme d'un complexe mercurique, LASCHLEIN et FUCHS (34) ont mis en évidence de nouveaux produits volatils qui sont présents dans la bière finie normale et le goût en fermentation.

Il s'agit du thioformaldéhyde, du dithioformaldéhyde et de la thioacétone. La formation de ces composés thiocarboxylés pourrait intervenir comme suit : du formaldéhyde formé durant l'ébullition du moût réagirait avec H_2S en début de fermentation peu après l'ensemencement des levures, ce qui donnerait du thioformaldéhyde et du dithioformaldéhyde par suite de la plus grande réactivité d' H_2S vis-à-vis de la fonction aldéhyde, plutôt que de la fonction alcool. Cette formation serait arrêtée très tôt, par suite de l'élimination rapide du formol dans le moût en fermentation et aussi à cause du caractère volatil du thioformaldéhyde ou encore de son aptitude à polymériser. La formation de la thioacétone serait calquée sur le même modèle, mais à l'opposé des précédents, sa formation atteindrait un maximum au milieu de la fermentation, pour décroître lentement en fin de fermentation principale et au début de la garde. L'auteur fait remarquer que bien que ces produits soient généralement des précurseurs de mercaptans, ce sont eux qu'on retrouve dans la bière et non leurs dérivés présusés.

VI - DEVELOPPEMENTS RECENTS des TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les applications à la bière des techniques d'analyse des produits soufrés ont donné lieu à l'élaboration d'un grand nombre de méthodes dont la diversité et l'abondance indiquent qu'elles sont seulement des moyens d'estimation et ne débouchent que très rarement sur des dosages d'une grande précision.

Ainsi encore très récemment LONGBLAD et DEMARE (30) remettent sérieusement en cause les dosages de SO_2 libre par les techniques d'entraînement à l'azote ou à l'air à volume constant dans les jus de raisin et dans le vin, car SO_2 lib est décomposé en plus ou moins grande quantité selon l'acidification apportée au milieu. Des difficultés sont à peu près équivalentes pour la bière.

L'évaluation de H_2S dans la bière a été améliorée par l'emploi des électrodes à membranes, telle qu'on en retrouve décrite l'utilisation dans les travaux de OLMEDO et BLICK (39). Cette méthode plus douce, puisque ne supposant pas de modification chimique préalable du milieu, semble être satisfaisante pour le dosage de H_2S qui est détecté à des teneurs de quelques nanogrammes par litre de bière. Elle a permis entre autre de constater que les méthodes d'analyses pratiquées jusqu'alors donnaient des résultats en excès parce qu'elles ne respectaient pas les combinaisons organiques labiles du soufre.

Les techniques de chromatographie sont le plus généralement retenues pour le dosage des autres constituants soufrés. Le développement des recherches de CIADA (33) a pour support une technique de chromatographie sur papier des mercaptans sous formes dérivées par combinaison avec le 2,4 dinitrobenzène. Mais la chromatographie en phase gazeuse couvre la majorité des travaux. Les produits soufrés volatils sont analysés directement ou sous forme dérivée ; une méthode de choix consiste à former des dérivés mercuriels qui sont ensuite vaporisés de façon instantanée dans un chromatographe en phase gazeuse (technique du "flash-exchange"), puis séparés sur colonne de phosphate de tricrésyl à 25 % (34).

SKANS et Coll. (40) ont décrit une méthode d'analyse des composés soufrés volatils notamment de H_2S et de ses dérivés organiques tels que les mercaptans, sulfures diallyliques et disulfures diallyliques, ainsi que de SO_2 libre ; la détection chromatographique est réalisée par un détecteur optique spécifique en utilisant les techniques de photométrie de flamme. Une technique similaire est reprise par LUTINSKI et COLL. (41) pour l'analyse des produits soufrés volatils renfermés dans l'atmosphère gazeuse de la bière (headspace).

La chromatographie en phase gazeuse est suivie d'une détection en photométrie de flamme qui mesure l'émission optique des composés soufrés dans une flamme riche en hydrogène, disposant d'un filtre à 594 mμ et d'un photomultiplicateur. Dans ces expériences, les additions de sulfure de diméthyl sont en rapport avec la mesure, mais la courbe étalon de 0 à 0,06 ppm dans la bière n'est pas linéaire.

Les auteurs indiquent que les thiols et H_2S ajoutés à la bière ou à l'eau ne sont pas détectés si l'on utilise des colonnes en acier inoxydable, ou en nylon, ou encore en verre. Ce sont les détecteurs métalliques qui seraient la cause des combinaisons préalables des produits non détectés.

En définitive, les récents développements des techniques analytiques ont permis de mettre en évidence des produits soufrés à l'état de trace et de les identifier à leurs homologues de synthèse. Cependant, bien que parfois très élaborées, les méthodes qui en découlent n'apportent pas encore toute la précision nécessaire aux déterminations les plus usuelles en Brasserie telles que le dosage de SO_2 et de H_2S .

VIII - CONCLUSION

Nous avons vu au cours de l'étude précédente que les matières premières, les conditions de fermentation et de stockage sont les facteurs essentiels responsables de l'origine de l'évolution des produits soufrés dans la bière. H_2S par son seuil de détection gustatif très bas et SO_2 par ses proportions plus importantes sont les éléments volatils principaux.

L'élimination de ces produits des matières premières, durant l'aération du moût à chaud est possible d'après LASCHELEIN (4), de même que d'autres précurseurs éventuels sont éliminés par filtration du trouble fin. Cependant, la technique de l'aération à chaud a été contestée depuis, notamment par LIEBENOW et ESSER (36) lors d'essais de séparateurs du type WESTFALIA. L'air est introduit sous pression de 4 kg/cm² pour donner une teneur en oxygène dissous de 7,8 ppm. Si la séparation du trouble fin est satisfaisante, il apparaît après fermentation que le goût de jeune est amplifié ; le faux goût demeure après filtration et même après coupage avec une autre bière ; il persiste aussi une certaine âcreté dans l'amertume. Ces défauts sont corrigés par l'adjonction de 20 g/Hl de charbon actif.

Des mercaptans à des taux de 30 à 50 % supérieurs à ce qu'ils sont lors d'une aération à froid seraient responsables de ce faux goût. Les auteurs concluent à une grande prudence dans l'application du procédé.

Les facteurs d'une grande importance pour l'évolution des produits soufrés durant la fermentation sont en rapport avec les précurseurs directs de l'hydrogène sulfuré et de l'anhydride sulfureux. A ce titre, l'équilibre du milieu entre les sulfates, la cystéine, agents précurseurs et la méthionine, agent régulateur, semble être le plus influent dans la production d'H₂S.

La fonction de l'acide pantothénique est beaucoup moins explicite, pour la raison que le moût possède une teneur suffisante en cette vitamine, et que Saccharomyces carlsbergensis serait capable de la synthétiser, comme tendent à le prouver les expériences de WEINFURTHNER (35) qui a montré que le taux en acide pantothénique s'accroissait dans le moût en fin de fermentation.

Seuls des cas de fermentations continues pourraient être néfastes à l'équilibre, puisqu'ainsi le développement de la levure est disproportionné vis-à-vis des apports en vitamines (13).

Le rôle de la méthionine paraît beaucoup plus directement attaché à la production d' H_2S dans le cas d'une carence des levures en cet aliment (5)(21) ; l'apport de grains crus, et surtout d'amidons ou de sucres à des degrés de plus en plus élevés de pureté, risque de déséquilibrer les milieux fermentaires en les appauvrissant en méthionine ; il s'ensuivrait alors une production d' H_2S à partir de sulfates renforcés par l'accélération de la décomposition de la cystéine.

L'anhydride sulfureux dont le taux augmente parfois durant la fermentation et qui est un intermédiaire de l'incorporation du soufre minéral dans les protéines n'influence que rarement les caractères organoleptiques de la bière, car son seuil de détection est très élevé (20 ppm pour des dégustateurs avertis, 50 ppm pour que le goût devienne caractéristique)(12).

Le choix de la souche de levure intervient aussi vis-à-vis de la production de H_2S , surtout lorsqu'on travaille en fermentations hautes où la température plus élevée a pour conséquence de stimuler la production d' H_2S . Souvent, une diminution de la température de fermentation de quelques degrés permet de freiner l'apparition intempestive du goût de jeune.

Durant le stockage, la formation du goût de soleil est liée à l'action directe de la lumière et d'une chaîne carbonée des isohumulones ; le précurseur soufré capable de former le β -méthyl-2-butène-1-thiol n'est pas véritablement connu ; aussi, le moyen de prévention essentiel est l'utilisation de bouteilles colorées en jaune-brun par des sels ferriques qui absorbent la

quasi totalité des longueurs d'ondes les plus actives sur la réaction photochimique. Il est à remarquer que les bouteilles vertes utilisées encore en grande quantité dans la Brasserie sont beaucoup moins efficaces quoiqu'elles freinent cependant le phénomène. Une seconde solution a été mise au point par KOCH et Coll. (37) qui préconisent le traitement chimique de la chaîne latérale des isohumulones pour transformer le carbonyle en alcool secondaire par réduction avec le borohydrure de sodium. De cette manière, il n'y a plus de combinaison possible entre carbonyle et groupements sulfhydrylés et l'on peut envisager de commercialiser la bière en bouteilles blanches.

Enfin, la présence d'ions métalliques tels que cuivre, fer, argent, zinc, dans la bière n'est pas recommandable parce qu'elle stimule la formation d' H_2S lors des élévations de température. C'est ce qui pourrait se produire pendant une pasteurisation classique. Notons cependant que l'influence de ces ions est plus néfaste encore eu égard à l'oxydation et à la formation des troubles. Pour préserver les troubles colloïdaux, on ajoute parfois des réducteurs qui peuvent aider au maintien du soufre sous une forme réduite plus active, donc plus néfaste pour l'arôme de la bière. La solution de compromis qui en découle est toutefois favorable à une bonne présentation du produit.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BRUNNER H.W. - OWADES J.L. - FAZIO T. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1955 - 125
- 2 - MAC WILLIAM I.C. -
J. Inst. Brew. 1 (74) 1968 - 38-54
- 3 - KLEBER W. - LAMBL E. -
Proc. Europ. Brew. Conv. 1955 - 290
- 4 - MASCHKELEIN C.A. - RAMOS - JEUNETONNE C. - DEVREUX A. -
Proc. Europ. Brew. Conv. 1961 - 148
- 5 - BRUNNER H.W. - OWADES J.L. - FAZIO T. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1955 - 133
- 6 - HAW G.A. -
Wallerstein Lab. Com. 28 (95) 1965 - 49
- 7 - BARNON-LEIGHT D.C. -
Proc. Europ. Brew. Conv. 1949 - 19
- 8 - JONES H. - PIERCE J.S. -
J. Inst. Brew. 70 - 1964 - 307
- 9 - BRUNNER H.W. - JATAS G. - OWADES J.L. -
J. Inst. Brew. 63 - 1957 - 408
- 10 - BRUNNER H.W. - SOMMERING G.J. - OWADES J.L. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1956 - 104

- 11 - STCHER H. - LASCHIVER C. -
Wallerstein Lab. Comm. 20 (71) 1957 - 361
- 12 - LAWRENCE W.C. -
Wallerstein Lab. Comm. 27 (93/94) 1964 - 123
- 13 - LAWRENCE W.C. - COLE D.R. -
Wallerstein Lab. Comm. 31 (105) 1968 - 95
- 14 - KLUYVER A.J. -
Intern. Congr. Microbiol. 6e Congr. 1953 - 71
- 15 - SCHELOSSEMAN K. - LITTELL F. -
Biochem. Z. 328 - 1957 - 591
- 16 - NOAT A.G. - LITTELL F. -
Wallerstein Lab. Comm. 28 (96) 1965 - 111
- 17 - HINDS H. - KUTTLER M. -
Biochem. Biophys. Res. Comm. 3 - 1960 - 140
- 18 - WILSON L.J. - ASHBY G. - WALBURGEN R.S. -
J. Biol. Chem. 236 - 1961 - 1022
- 19 - HASSOT V. - WILLIAMS C.L. -
J. Biol. Chem. 240 - 1965 - 4470
- 20 - HAN G.A. -
J. Gen. Microbiol. 31 - 1963 - 247-259
- 21 - STEWART D.D. - HEINE C. - BRENNER H.W. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1962 (40-46)

- 22 - de VITO F.C. - BRETFUSS J. -
J. Bact. 60 - 1964 - 1941
- 23 - WASHIMOTO H. - ARAIYAKI I. - KUROIWA Y. -
Report. Res. Lab. Kirin Brew. Co L^{td} 11 - 1968 - 43
- 24 - GRAY P.R. - STONE I. - ROTCHILLI H. -
Wallerstein Lab. Comm. 10 (29) - 1947 - 5
- 25 - OBATA Y. - KOSHIIKA M. - TANAKA H. -
Wallerstein Lab. Comm. (résumé) 24 (85) - 1961 - 340
- 26 - KUROIWA Y. - WASHIMOTO H. - KOKUBO D. -
NAKAGAWA K. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1963 - 181
- 27 - KUROIWA Y. - WASHIMOTO H. -
Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co L^{td} 1961 - 35-40
- 28 - KUROIWA Y. - WASHIMOTO H. -
Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co L^{td} 1961 - 29-34
- 29 - KILGER F. -
Brauwissenschaft 17 (6) 1964 - 212
- 30 - KILGER F. -
Tageszeitung für Brauerei 141/142 (65) 1966 - 360
- 31 - KILGER F. -
Brauwissenschaft 4 (21) 1968 - 131
- 32 - SCHOLLEIN A. HALL R.D. - THORBURN BURNS D. -
Proc. Europ. Brew. Conv. 1969 - 427

- 33 - OKUDA H. -
Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co ¹⁷ 10 - 1967 - 9
- 34 - KASAHARA H. - ISHIGURO Y. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1966 - 121
- 35 - WEINFURTER F. - ESCHENBACHER F. - THOSS G. -
Brauwissenschaft 17 - 1964 - 175
- 36 - LIEBENOW R. - ESSER K.D. -
Monats. Brau. 1 (20) 1967 - 23
- 37 - KOCH G.H. - KUNWIG W.C. - KESSEL T.L. -
Résumé Brevet U.S. - Wallerstein Lab. Comm. 26 - (90) 19
131
- 38 - DEEBLER L. - BERNARD P. -
Chimie Analytique 52 (4) 1970 - 412
- 39 - CHAPES J.L. - BLICK S.R. - OWINGS S.H. -
Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1967 - 75-78
- 40 - BREWS B. - BARWALD G. - HENNING H.J. -
Monats. Brau. 22 - 1969 - 140
- 41 - HARRISON G.A.F. - COOTE C.H. -
J. Chromatog. 41 - 1969 - 455

